

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-33183

(P2003-33183A)

(43) 公開日 平成15年2月4日 (2003.2.4)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/15	4 B 0 2 4
1/15		1/19	4 B 0 5 0
1/19		1/21	4 B 0 6 5
1/21		9/80	Z
5/10		15/00	Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 18 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-187433 (P2001-187433)

(22) 出願日 平成13年6月21日 (2001.6.21)

(71) 出願人 000004477

キッコーマン株式会社

千葉県野田市野田250番地

(72) 発明者 松島 健一郎

千葉県野田市野田250番地キッコーマン株式会社内

(72) 発明者 伊藤 考太郎

千葉県野田市野田250番地キッコーマン株式会社内

(72) 発明者 小山 泰二

千葉県野田市野田250番地キッコーマン株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グルタミナーゼ、グルタミナーゼ遺伝子、新規な組み換え体DNA及びグルタミナーゼの製造法

(57) 【要約】 (修正有)

【解決手段】 以下の (a) 又は (b) のグルタミナーゼ及び (a) 特定の配列に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質 (b) アミノ酸配列 (a) において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルタミナーゼ活性を有するタンパク質以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードするグルタミナーゼ遺伝子。 (a) に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質 (b) アミノ酸配列 (a) において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルタミナーゼ活性を有するタンパク質

【効果】 本発明によれば、グルタミナーゼを効率よく生産することができるので、本発明は、産業上極めて有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)のグルタミナーゼ。

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルタミナーゼ活性を有するタンパク質

【請求項2】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするグルタミナーゼ遺伝子。

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルタミナーゼ活性を有するタンパク質

【請求項3】 以下の(a)又は(b)のDNAからなるグルタミナーゼ遺伝子。

(a) 配列番号1に示される塩基配列からなるDNA

(b) (a)の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、グルタミナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項4】 請求項2又は3記載のグルタミナーゼ遺伝子をベクターDNAに挿入したことを特徴とする新規な組み換え体DNA。

【請求項5】 請求項4記載の組み換え体DNAを含む形質転換体又は形質導入体。

【請求項6】 請求項5記載の形質転換体又は形質導入体を培地に培養し、培養物からグルタミナーゼを採取することを特徴とするグルタミナーゼの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、グルタミナーゼ、グルタミナーゼ遺伝子、新規な組み換え体DNA及びグルタミナーゼの製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】グルタミナーゼは、L-グルタミンを加水分解して、アンモニア及びうま味成分であるL-グルタミン酸を生成させる酵素である。グルタミナーゼは、食品加工工業において重要な役割を果たしており、例えば、醤油あるいはタンパク質を酵素的に分解して得られる調味食品を製造する際に有用である。グルタミナーゼは、種々の生物種から単離されており、その酵素学的性質及びその遺伝子についての報告がなされている(例えば、特公平6-38748号公報)。醤油製造並びに麹菌を利用した調味食品の製造において、グルタミナーゼを遺伝子工学的手法で更に向上させ本酵素を多量に生産するためには、麹菌由来の本酵素の取得が重要である。これにより、容易にタンパク質加水分解物(例えば、醤油)の品質を向上させることができ、かつ安価に提供することが可能となる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、麹菌由来のグルタミナーゼ、グルタミナーゼ遺伝子、新規な組み換え体DNA及びグルタミナーゼの製造法の提供を目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明者等は、上記課題について種々検討した結果、アスペルギルス・ソーヤ(*Aspergillus sojae*)由来のグルタミナーゼ遺伝子を単離し、構造決定することに成功し、本発明を完成した。即ち、第1の発明は、以下の(a)又は(b)のグルタミナーゼである。

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルタミナーゼ活性を有するタンパク質
第2の発明は、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするグルタミナーゼ遺伝子である。

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルタミナーゼ活性を有するタンパク質
第3の発明は、以下の(a)又は(b)のDNAからなるグルタミナーゼ遺伝子である。

(a) 配列番号1に示される塩基配列からなるDNA

(b) (a)の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、グルタミナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

第4の発明は、上記グルタミナーゼ遺伝子をベクターDNAに挿入したことを特徴とする新規な組み換え体DNAである。第5の発明は、上記組み換え体DNAを含む形質転換体又は形質導入体である。第6の発明は、上記形質転換体又は形質導入体を培地に培養し、培養物からグルタミナーゼを採取することを特徴とするグルタミナーゼの製造法である。

【0005】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に説明する。

1. グルタミナーゼ及びそれをコードする遺伝子。本発明のグルタミナーゼは、以下の(a)又は(b)のグルタミナーゼである。

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルタミナーゼ活性を有するタンパク質
(a)に示すタンパク質は、アスペルギルス(*Aspergillus*)属糸状菌の染色体DNA又はcDNA由来の天然型グルタミ

ナーゼ遺伝子をクローニングし、これを適当なベクター-宿主系に導入して発現させることにより得られる。なお、該タンパク質は、(b)に示す通り、グルタミナーゼ活性を有する限り、(a)のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されていてもよい。本発明において「複数」とは、アミノ酸残基のグルタミナーゼタンパク質の立体構造における位置又は種類によっても異なり、通常2〜300個、好ましくは、2〜170個、更に好ましくは、2〜50個、最も好ましくは、2〜10個を意味する。

【0006】そのような変異型グルタミナーゼ、すなわち上記(b)のタンパク質は、天然型グルタミナーゼ遺伝子の塩基配列に対して置換、欠損、挿入、付加又は逆位等の変異を導入して変異型グルタミナーゼ遺伝子を作製し、これを適当なベクター-宿主系に導入して発現させることにより得られる。遺伝子への変異導入法としては、例えば、部位特異的変異誘導法、PCRによるランダム変異導入法、更には、遺伝子を選択的に開裂し、次いで、選択されたヌクレオチドを除去又は付加した後、遺伝子を連結する方法等が挙げられる。本発明のグルタミナーゼ遺伝子は、上記(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子である。なお、本発明のグルタミナーゼ遺伝子は、(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、グルタミナーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。本発明において「ストリンジェントな条件」とは、例えば、ナトリウム濃度が50〜300mM、好ましくは150mMであり、温度が42〜68℃、好ましくは65℃での条件をいう。

【0007】上記(a)のタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子の一例としては、配列番号1記載の塩基配列を含むDNAが挙げられる。このDNAは、天然型グルタミナーゼ遺伝子である。天然型グルタミナーゼ遺伝子は、アスペルギルス属に属する糸状菌の染色体DNA又はcDNA由来の天然型遺伝子をクローニングすることにより得られる。遺伝子のクローニング方法としては、例えば、グルタミナーゼを精製して部分アミノ酸配列を決定した後、適当なプローブDNAを合成し、これを用いてアスペルギルス・ソーヤ染色体DNAからスクリーニングする方法が挙げられる。又、部分アミノ酸配列に基づき適当なプライマーDNAを作製して、5-RACE法又は3'-RACE法等の適当なポリメラーゼ連鎖反応(以下、PCR法と略称する。)により、該遺伝子の断片を含むDNAを増幅させ、これらを連結させて全長の遺伝子を含むDNAを得る方法も挙げられる。より詳細には、天然型グルタミナーゼ遺伝子は、以下のようにして取得できる。先ず、アスペルギルス・ソーヤFERM BP-6820を培養し、得られた菌体を液体窒素中で凍結させた後、乳鉢等を用いて物理的に磨砕することによりこまかい粉末状の菌体片

とし、該菌体片から通常の方法により全RNA画分を抽出する。該抽出操作には、市販のRNA抽出キットが利用できる。

【0008】得られたRNA抽出液からエタノール沈殿によりRNAを回収し、このRNAから通常の方法によりポリA鎖を有するRNAを分画してもよい。該分画操作には市販のOligo dTカラムが利用できる。配列番号2のDNA配列を参考としてPCRに用いるプライマーを合成する。このプライマーDNAと上記のようにして得られたRNAを使用し、5-RACE法や3'-RACE法等の適当なRT-PCR反応により、該遺伝子の断片を含むDNAを増幅させ、これらを連結させて全長の遺伝子を含むDNAを得る。5-RACE法や3'-RACE法による部分cDNA合成操作には市販のキットが利用できる。前記cDNAを鋳型として、5末端配列及び3'末端配列に相補的な合成プライマーを用いてPCRを行なうことにより、DNAを増幅する。増幅されたDNAは、通常の方法に準じてクローニングできる。増幅されたDNAを適当なベクターに挿入して組み換え体DNAを得る。クローニングには、TA Cloning Kit (Invitrogen社)等の市販のキットや、pUC119 (宝酒造社製)、pBR322 (宝酒造社製)、pBluescript SK+ (Stratagene社製)等の市販のプラスミドベクターDNA、λEMBL3 (Stratagene社製)等の市販のパクテリオファージベクターDNAが使用できる。

【0009】得られた組み換え体DNAを用いて、例えば、大腸菌K-12、好ましくは大腸菌JM109 (宝酒造社製)、XL-Blue (Stratagene社製)等を形質転換又は形質導入して、夫々形質転換体又は形質導入体を得る。形質転換は、例えば、D.M.Morrisonの方法(Methods in Enzymology, 68, 326-331, 1979)により行なうことができる。また、形質導入は、例えば、B.Hohnの方法(Methods in Enzymology, 68, 299-309, 1979)により行なうことができる。宿主細胞としては、大腸菌の他、他の細菌、酵母、糸状菌、放線菌等の微生物や動物細胞等が利用できる。上記で増幅されたDNAの全塩基配列(配列番号1参照)は、例えば、Li-COR MODEL 4200Lシークエンサー(アロカ社より購入)、370DNAシークエンスシステム(パーキンエルマー社製)、CEQ2000XL DNAアナリシスシステム(ベックマン社製)を用いて解析できる。塩基配列を、部分アミノ酸配列の情報と比較することにより、天然型グルタミナーゼ遺伝子が取得できたか否かを確認することができる。そして、天然型グルタミナーゼ遺伝子の解析により、翻訳されるポリペプチド、すなわち、(a)のタンパク質のアミノ酸配列が確定される。

【0010】2. グルタミナーゼの製造法

本発明のグルタミナーゼを製造する場合は、先ず、グルタミナーゼ遺伝子を含有する組み換え体DNAを作製する。次いで、該組み換え体DNAを含む形質転換体又は形質導入体を作製し、これらを培養し、培養物からグルタミナーゼを採取すればよい。本発明のグルタミナーゼ遺

10

20

30

40

50

伝子を用いて、グルタミナーゼ活性を有するタンパク質を生産するためには、好適なベクター-宿主系を選択する必要がある。そのような系としては、pST14 (Unkles et al., 1989, Mol. Gen. Genet., 218, 99-104) 及び糸状菌〔アスペルギルス・ソーヤ (*Aspergillus sojae*)、アスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニドゥランシ (*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、ペニシリウム・チリゾゲナム (*Penicillium chrysogenum*) 等〕の系、酵母発現ベクターpYES2 (Invitrogen社製) 及び酵母サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の系、大腸菌発現ベクターpTE (Stratagene社製) 及び大腸菌エッシャーリシア・コリ (*Escherichia coli*) の系等が挙げられる。タンパク質への糖鎖付加がおこるといふ点で糸状菌又は酵母の系を使用することが好ましい。組み換え体DNAは、グルタミナーゼ遺伝子を適当なベクターに挿入することにより得られる。ベクターとしては、市販品、例えば、酵母発現ベクターpYES2、pYD1 (Invitrogen社製)、pUR123 (宝酒造社製)、pYEX-BX、pYEX-S1、pYEX-4T (CLONTECH社製)、大腸菌発現ベクターpSET (Invitrogen社製)、pTE (Stratagene社製) 等が使用できる。

【0011】次いで、該組み換え体DNAを宿主細胞に形質転換又は形質導入する。酵母への形質導入は、例えば、Becker DM等の方法 (Methods in Enzymology, 194, 182-187, 1991) により行なうことができる。宿主細胞としては、大腸菌又は酵母の他、他の細菌、糸状菌、放線菌等の微生物あるいは動物細胞が使用可能である。以上によりグルタミナーゼ生産能を有する形質転換体又は形質導入体が得られる。形質転換体又は形質導入体を培養するには、通常の固体培養法で培養しても良いが、可能なかぎり液体培養法を採用することが好ましい。宿主として酵母を用いた場合、培地としては、例えば、YPD培地あるいはYM培地等の一般的な富栄養培地が使用できる。また、宿主の遺伝的性質から選択培地を使用する場合は、最小培地であるSD培地が使用できる。選択培地を使用する場合は、使用した宿主ベクター系によって選択圧が異なるため、適宜、宿主の遺伝的要求性に応じて、選択圧以外のアミノ酸あるいは核酸等を、最小培地に添加する。その他、必要により、培地に無機塩類、糖質原料、ビタミン類等を適宜添加してもよい。なお、培地の初発pHは、pH6～9に調製するのが適当である。更に、使用するベクターによってはタンパク質の発現を調節できるものもある。それらのベクターを使用する場合は、ベクターに応じた誘導剤、例えば、ガラクトースや銅イオンを添加してグルタミナーゼを誘導することができる。酵母を培養する場合は、25～35℃、好ましくは30℃前後で、24～48時間通気攪拌深部培養、振盪培養、静置培養等により培養することが好ましい。発現したグルタミナーゼを、特開平11-332553号公

報記載の方法を一部改変した方法により精製できる。酵母の場合では、該形質転換酵母を上記の適当な方法で培養後、培養液を遠心分離して菌体を得る。該菌体に細胞壁溶解酵素を加え十分に細胞壁を溶解させた後、遠心分離して上澄み液を得る。この上澄み液に硫酸アンモニウムを添加し塩析させ、更に、遠心分離して不溶性タンパク質を除きグルタミナーゼを含む粗酵素液を得る。粗酵素液からフェニルセファロースカラム、DEAE-セファロースカラム、ゲル濾過カラム、HPLCを用いて、グルタミナーゼ活性画分を精製することにより精製されたグルタミナーゼを得ることができる。なお、本発明における遺伝子工学的方法は、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-8769-309-6、「Current Protocols in Molecular Biology」(1989)、John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-50338-X等の記載に準じて実行可能である。

【0012】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に具体的に説明する。

実施例1 グルタミナーゼcDNAの取得

(1) アスペルギルス (*Aspergillus*) 属菌におけるグルタミナーゼ相同遺伝子の検索

既知のクリプトコッカス由来グルタミナーゼ遺伝子 (特願2000-270371号公報) と相同性の高い遺伝子を独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターの麹菌ESTライブラリーから検索したところ、711塩基からなるESTクローンContig Mix0010110003775_1を得た。該クローンをグルタミナーゼ遺伝子の断片であると推定し、該遺伝子のcDNAのクローニングを行なった。

【0013】アスペルギルス・ソーヤ (*Aspergillus sojae*) からの全RNA抽出

アスペルギルス・ソーヤFERM BP-6820の胞子を大豆粉培地 (3% 大豆粉、1% KH_2PO_4 、pH6.0) 50mlに 3×10^5 /mlとなるように接種し、150ml三角フラスコ中で30℃、48時間、150r.p.m.で振盪培養した。培養終了後得られた培養液をMiracloth (CALBIOCHEM社製) で濾過して菌体を集めた。集めた菌体を滅菌水で洗浄した後、液体窒素中で凍結させ乳鉢を用いて物理的に磨砕し、細かい粉末状の菌体片とした。菌体片からISOGEN (ニッポンジーン社製) を用いて全RNAを抽出した。全ての操作は添付のプロトコールに従った。

【0014】(2) RACE法を用いたグルタミナーゼcDNAの取得

上記で得られた全RNA約200μgからOligotex-dT30<Super> mRNA Purification Kit (宝酒造社製) を用いて4μgのmRNAを得た。そのうち1μgのmRNAからMarathon cDNA Amplification Kit (Clontech社製)、Advantage cDNA PCR kit (Clontech社製) を用いて5'-RACE及び3'-RACEを行なった。RACE法に使用するプライマーとして配列

10

20

30

40

50

番号3～6で夫々表されるオリゴDNAを合成した。すなわち5-RACEを行なうためにESTクローンCONFIG MIX0010110003775_1に対してアンチセンスのプライマー（配列番号3及び4）及び3'-RACEを行なうためのセンスのプライマー（配列番号5及び6）である。全ての操作は添付のプロトコールに従った。PCRの装置としてGeneAmp5700

DNA detection system（Perkin Elmer社製）を使用した。その結果、グルタミナーゼcDNA 5'領域に相当する約1.7kbのDNA断片及び3'領域に相当する約0.8kbのDNA断片の増幅を確認した。増幅されたDNA断片を0.7%アガロースゲル中で分離し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて抽出した。操作は添付のプロトコールに従った。抽出されたDNA断片は、TOPO TA Cloning Kit（Invitrogen社製）を用いてpCR2.1-TOPOベクターに組み込んだ。得られた組み換え体プラスミドは、Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit（Amersham Pharmacia Biotech社製）を用いてシークエンス反応を行ない、LI-COR MODEL4200Lシークエンサー（アロカ社より購入）で塩基配列を決定した。その結果配列番号1に示す約1.9kbのオープンリーディングフレーム（ORF）のDNA配列が明らかとなり、ESTクローンCONFIG MIX0010110003775_1はその部分断片であることが明らかとなった。

【0015】このDNAは、643アミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。このアミノ酸配列は、配列番号2に記載する。更に、このアミノ酸配列を公知のアミノ酸配列データベースに対して相同性検索した。相同性検索には、NCBI BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)を用いた。その結果公知のタンパク質で該ORFと一致するものはなかった。しかし、クリプトコッカス・アルビダス及びクリプトコッカス・ノダエンシス由来グルタミナーゼとの相同性検定を行なったところ、活性中心と予想される領域で相同性が認められ、該ORFがグルタミナーゼをコードしていることが示唆された。5-RACEを行なう際作製したcDNAを鋳型としてPCRを行ない、グルタミナーゼの全長cDNAをクローニングした。プライマーには配列番号7及び8に示すオリゴDNAを用いた。得られた約2.1kbの増幅DNA断片は、既に述べた方法で抽出しTOPO TA Cloning Kit（Invitrogen社製）を用いてpCR2.1-TOPOベクターに組み込み、グルタミナーゼ全長cDNAを含む組み換え体プラスミドpASglnを得た。組み換え体プラスミドpASglnの塩基配列を再び解析し、グルタミナーゼcDNAの塩基配列を確定した（配列番号1）。全長グルタミナーゼcDNA、すなわち、配列番号1の塩基番号1～1932で表される塩基配列を含むplasmid pASglnは、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにFERM BP-7634として寄託されている。

【0016】実施例2 グルタミナーゼcDNAの発現

上記のplasmid pASglnを制限酵素Bam HI及びSph I（共に宝酒造社製）で酵素処理した後、0.7%アガロースゲル

電気泳動に供し、目的の大きさ（約2.0 kbp）のDNA断片を切り出し精製した。次いで、これらDNA断片を同制限酵素で酵素処理した酵母発現ベクターpYES2（Invitrogen社製）に組み込み、組み換え体プラスミドpYES-ASglnを作製した。上記の組み換え体プラスミドは、ガラクトースにより目的タンパク質グルタミナーゼの誘導発現が可能である。宿主は、添付のINVScl（Genotype:MATa, his3Δ1, leu2, trp1-289, ura3-52/ MATα, his3Δ1, leu2, trp1-289, ura3-52）を使用し、酢酸リチウム法により、上記の組み換え体プラスミド pYES-ASglnで宿主酵母を形質転換した。選択培地には、0.67% Yeast Nitrogen base without aminoacids（Difco社製）、2% raffinose（和光純薬工業社製）及び0.192% Yeast Synthetic Dropout Medium Supplement without uracil（SIGMA社製）を使用した。酢酸リチウム法は、「タンパク質実験プロトコール-機能解析編-」（細胞工学別冊：秀潤社）の記載に従った。次いで、得られた形質転換体を用いて、pYES2ベクター（Invitrogen社製）に添付のプロトコールに従い、タンパク質の発現を行なった。200 ml用コブ付三角フラスコを用いて選択培地20 mlに形質転換体をコロニーより植菌し、30℃、140 r.p.m.で約14時間振盪培養し、これを種培養とした。

【0017】次いで、種培養の濁度(OD₆₀₀)を測定し、初期濁度がOD₆₀₀ = 0.4となるようにタンパク質発現誘導培地へ種培養を接種した。タンパク質発現誘導培地による培養は500 ml用坂口フラスコを使用し、培地50 mlで30℃、140 r.p.m.で振盪培養した。タンパク質発現誘導培地は、1% Yeast Extract（Difco社製）、2% Poly Peptone（日本製薬株式会社製）、1% raffinose及び2% galactose（以上SIGMA社製）を使用した。遠心、集菌した菌体を蒸留水に懸濁し酵素液として供した。グルタミナーゼ活性は、特開平11-332553号公報記載の方法を一部改変した方法で測定した。すなわち、2%(W/V) L-グルタミン溶液250 μlに0.2 Mリン酸緩衝液(pH 6.5) 500 μl及び酵素液500 μlを加え、37℃、30分間反応させた後、0.75 N過塩素酸液250 μlを添加して反応を停止させ、これに1.5N水酸化ナトリウム液125 μlを加え、反応液を中和した。上記の反応液を遠心(10000 r.p.m.、10分)し、上清100 μlに0.1 M塩酸ヒドロキシルアミン緩衝液1.0 ml (pH 8.0)、20 mM NAD⁺溶液（オリエンタル酵母社製）1.0 ml及び500単位/mlのL-グルタミン酸脱水素酵素液（SIGMA社製）50 μlを添加し、37℃で30分間反応させ、分光光度計により340 nmにおける吸光度を測定した。上記の条件下で1分間あたり1 μモルのグルタミン酸を生成する酵素量を1単位(U)とした。

【0018】形質転換体のグルタミナーゼ活性測定の結果を表1に示す。表中の数値は、培養24時間後（OD₆₀₀ = 15）の培養液1 ml当たりのグルタミナーゼ活性（mU/ml）を示す。「pYES2」は、プラスミドpYES2による形質転換体、「pYES-ASgln」は、プラスミドpYES-ASglnによ

10

20

30

40

50

る形質転換体を夫々示す。また「-」は、ガラクトース
を含まないタンパク質発現非誘導培地、「+」は、ガラ
クトースを含むタンパク質発現誘導培地で誘導したこと*

*を示す。
表1

プラスミド/ガラクトース	-	+
PYES2	0.33	2.50
PYES-ASgln	4.64	32.87

プラスミドpYES-ASglnの形質転換体は、ガラクトースを
含むタンパク質発現誘導培地で培養した際にプラスミド
pYES2の形質形質転換体と比較してグルタミナーゼ活性
が上昇していた。また、プラスミドpYES-ASglnの形質形
質転換体をガラクトースを含まないタンパク質非発現誘
導培地で培養した時はグルタミナーゼ活性は、上昇しな
かった。このことからプラスミドpYES-ASglnの形質形質
転換体のグルタミナーゼ活性は、導入したグルタミナー
ゼ遺伝子に由来することが明らかとなった(表1)。宿※

※主にINVSc1を用いてグルタミナーゼを発現させた場合に
もアスペルギルス属菌と同様にグルタミナーゼ活性は、
菌体表面に発現した。

【0019】

【発明の効果】本発明によれば、グルタミナーゼを効率
よく生産することができるので、本発明は、産業上極め
て有用である。

【0020】

SEQUENCE LISTING

<110> KIKKOMAN CORPORATION

<120> A GLUTAMINASE, A GLUTAMINASE GENE, A NOVEL RECOMBINANT DNA,
AND A PROCESS FOR PRODUCING A GLUTAMINASE

<130> P2218

<160> 8

<210> 1

<211> 1932

<212> DNA

<213> Aspergillus sojae

<400> 1

```

atg ttt ctt agt aca ctc ctc tca ctg gcg gcg glc gtt gcc ggc gct   48
gcc atc ccc aat ggc cag acg ctt tct ctc aat gac att cct tac tat   96
gtg agc ggc att cct gtg tca act ttg caa ggg tac aat gcc tct gca  144
tat gct gct ttg aca aag gga ata gat ttg gtg cca tta act gtc att  192
cct gta act cct acc acg aac ttg gag tgg ctg cta tgg gac tat gtt  240
gaa cgc gat gat gtc ttc cag ccg gct ttt ctg cgt gca gtc tat ctc  288
aca gct tcc act gct gat gac att gac tcc caa ctg agc aat tat gcg  336
tca att ctc aag tct tcc ggc acc gac gtg ctg ctg gtt gat tca gaa  384
gta cac acc gct tgg tca gat tcc aca atc aca gcg cag ttg acc aaa  432
gag ctg ccg agt ggg cct tat ttt gtc tcc ttg tat act gga gag gtg  480
ttt aga gcg tac cgg ttg tac cct gac gac aac cta gct ttc att caa  528
gca gga atc agt gac gag aag gga ggt gtc ctg ccc cta cca gcc gtg  576
aca gaa aac gcg atg acc aaa gac gtt gcc gtg cct tca cgt ctc tat  624
tat aca ccg acc gca gaa aag cca tta gcc ggt ctg agg tta ggt gtc  672
aag gat atc tac cac gtt aaa ggt ctc aag acg agt ggc ggc agt cgc  720
tcc tat tat tat tta tac gga act cag aat gtc act gcc cca tct att  768
cag aga ctg ttg gac tta ggc gcg gtc ttt gtc ggt aaa act ggg acc  816
ggt cag ttt gct aac ggt gat cga cct act gcc gac tgg gtg gat ttc  864
cac tgt cca ttc aac caa cgc gga gaa gga tat cag gca cct agc ggt  912
tcc tcc tcc ggc tca ggt gtg gct att gca gcc tac gac tgg ttg gac  960
ctt gct gtc ggt agt gac act ggc ggt tca atg cgt tcc cca gct gca 1008
gtt caa ggg ata tat ggc aac agg cca tct act ggc gct atc tct cta 1056

```

11

12

gat cat gtc tta cct ctc tcg ccg gct ctg gat aca gcg ggc gtc ttt	1104
gcc cga agt gcc tca cta tgg tcc cat act gtg caa gct tgg tat cct	1152
cat ctc cag cac aat ttt acg tcc ttc cct cgg cag ctg ctc cta gcc	1200
ggg ggt gga tgg gat ggt aaa ggc atc agt ccc gag gcc cat cag agt	1248
ctt acc aca ttc aca cgt ggg ctt gag gca ttc ctc gga aca aac cat	1296
acc aat gtc gac gtg tcg cag cga tgg ctt gac aca cac tct ccc acc	1344
aca cca agc ctg gaa gag atg ctc aac ctg acc tat gcc aca ctt act	1392
tct gtg gat cag ttc aac cac cta gcc gtc cct ctc ttt gct gac tat	1440
aaa gcc gtc cac cgc ggt cgt cag cct ttc att aac ccc ggc cca tta	1488
gcg cgt tgg cag tgg ggc cag gcg aat ggc gga aac acc tcg tac gat	1536
gca gct ctg cgc aac atg act act ttc cga aac tgg tgg gag aag tcc	1584
ggg tat ggt cag tcc gat aat gcc tct tgc tcc agg tcg ctt ttc gtc	1632
agt gtg tat tcg gtc ggc acc act gac tac cgt aac caa tat tat gag	1680
gcg ccc act aca ccc cca ctg gga ttc tcg atc gga cgc atc gcg gta	1728
tta ggt gga gca cct gag gtt gtt gtt cct gtg gga gag tcc cca tac	1776
aat agt act atc tct ttg cag acc gag tat ttg ccg gtc agt gtt gcg	1824
ctg cag atg gcg cga gga tgt gac cat gtt ctg gct tcc ttg gtc gct	1872
ggc ctt gag aag aag ggc gtc ctc cga cct gtc agt acc ggc tct cgc	1920
cta tac tcc taa	1932

【0021】

20

<210> 2

<211> 643

<212> PRT

<213> Aspergillus sojae

<400> 2

Met Phe Leu Ser Thr Leu Leu Ser Leu Ala Ala Val Val Ala Gly	
1 5 10 15	
Ala Ala Ile Pro Asn Gly Gln Thr Leu Ser Leu Asn Asp Ile Pro	
20 25 30	
Tyr Tyr Val Ser Gly Ile Pro Val Ser Thr Leu Gln Gly Tyr Asn	
35 40 45	
Ala Ser Ala Tyr Ala Ala Leu Thr Lys Gly Ile Asp Leu Val Pro	
50 55 60	
Leu Thr Val Ile Pro Val Thr Pro Thr Thr Asn Leu Glu Ser Leu	
65 70 75	
Leu Ser Asp Tyr Val Glu Arg Asp Asp Val Phe Gln Pro Ala Phe	
80 85 90	
Leu Arg Ala Val Tyr Leu Thr Ala Ser Thr Ala Asp Asp Ile Asp	
95 100 105	
Ser Gln Leu Ser Asn Tyr Ala Ser Ile Leu Lys Ser Ser Gly Thr	
110 115 120	
Asp Val Leu Leu Val Asp Ser Glu Val His Thr Ala Ser Ser Asp	
125 130 135	
Ser Thr Ile Thr Ala Gln Leu Thr Lys Glu Leu Pro Ser Gly Pro	
140 145 150	
Tyr Phe Val Ser Leu Tyr Thr Gly Glu Val Phe Arg Ala Tyr Arg	
155 160 165	
Leu Tyr Pro Asp Asp Asn Leu Ala Phe Ile Gln Ala Gly Ile Ser	
170 175 180	
Asp Glu Lys Gly Gly Val Leu Pro Leu Pro Ala Val Thr Glu Asn	

	185	190	195
Ala Met Thr Lys Asp Val Ala Val Pro Ser Arg Leu Tyr Tyr Thr			
	200	205	210
Pro Thr Ala Glu Lys Pro Leu Ala Gly Leu Arg Leu Gly Val Lys			
	215	220	225
Asp Ile Tyr His Val Lys Gly Leu Lys Thr Ser Gly Gly Ser Arg			
	230	235	240
Ser Tyr Tyr Tyr Leu Tyr Gly Thr Gln Asn Val Thr Ala Pro Ser			
	245	250	255
Ile Gln Arg Leu Leu Asp Leu Gly Ala Val Phe Val Gly Lys Thr			
	260	265	270
Gly Thr Val Gln Phe Ala Asn Gly Asp Arg Pro Thr Ala Asp Trp			
	275	280	285
Val Asp Phe His Cys Pro Phe Asn Gln Arg Gly Glu Gly Tyr Gln			
	290	295	300
Ala Pro Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Gly Val Ala Ile Ala Ala			
	305	310	315
Tyr Asp Trp Leu Asp Leu Ala Val Gly Ser Asp Thr Gly Gly Ser			
	320	325	330
Met Arg Ser Pro Ala Ala Val Gln Gly Ile Tyr Gly Asn Arg Pro			
	335	340	345
Ser Thr Gly Ala Ile Ser Leu Asp His Val Leu Pro Leu Ser Pro			
	350	355	360
Ala Leu Asp Thr Ala Gly Val Phe Ala Arg Ser Ala Ser Leu Trp			
	365	370	375
Ser His Thr Val Gln Ala Trp Tyr Pro His Leu Gln His Asn Phe			
	380	385	390
Thr Ser Phe Pro Arg Gln Leu Leu Leu Ala Gly Gly Gly Trp Asp			
	395	400	405
Gly Lys Gly Ile Ser Pro Glu Ala His Gln Ser Leu Thr Thr Phe			
	410	415	420
Thr Arg Gly Leu Glu Ala Phe Leu Gly Thr Asn His Thr Asn Val			
	425	430	435
Asp Val Ser Gln Arg Trp Leu Asp Thr His Ser Pro Thr Thr Pro			
	440	445	450
Ser Leu Glu Glu Met Leu Asn Leu Thr Tyr Ala Thr Leu Thr Ser			
	455	460	465
Val Asp Gln Phe Asn His Leu Ala Val Pro Leu Phe Ala Asp Tyr			
	470	475	480
Lys Ala Val His Arg Gly Arg Gln Pro Phe Ile Asn Pro Gly Pro			
	485	490	495
Leu Ala Arg Trp Gln Trp Gly Gln Ala Asn Gly Gly Asn Thr Ser			
	500	505	510
Tyr Asp Ala Ala Leu Arg Asn Met Thr Thr Phe Arg Asn Trp Trp			
	515	520	525
Glu Lys Ser Gly Tyr Gly Gln Ser Asp Asn Ala Ser Cys Ser Arg			
	530	535	540
Ser Leu Phe Val Ser Val Tyr Ser Val Gly Thr Thr Asp Tyr Arg			
	545	550	555
Asn Gln Tyr Tyr Glu Ala Pro Thr Thr Pro Pro Leu Gly Phe Ser			

	560		565		570
Ile Gly Arg Ile Ala Val Leu Gly Gly Ala Pro Glu Val Val Val					
	575		580		585
Pro Val Gly Glu Ser Pro Tyr Asn Ser Thr Ile Ser Leu Gln Thr					
	590		595		600
Glu Tyr Leu Pro Val Ser Val Ala Leu Gln Met Ala Arg Gly Cys					
	605		610		615
Asp His Val Leu Ala Ser Leu Val Ala Gly Leu Glu Lys Lys Gly					
	620		625		630
Val Leu Arg Pro Val Ser Thr Gly Ser Arg Leu Tyr Ser					
	635		640		643

【0022】

<210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 3

tag cta tgg tcc cgt act gtg caa gct tgg 30

【0023】

<210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 4

atg gct tga cac aca atc tcc cac cac acc 30

【0024】

<210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 5

gca gcg caa cac tga ccg gca aat act cgg 30

【0025】

<210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 6

aag agc gac ttg gag cag gag gca cat cgg 30

【0026】

<210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 7

ggl gac aga ctg gal cca tca tgt ttc tta 30

【0027】

<210> 8
 <211> 30
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

ttg ttt gaa ccg gca tgc tct act ttg tac 30

【手続補正書】

【提出日】平成14年11月1日(2002.11.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正内容】

【書類名】 明細書

【発明の名称】 グルタミナーゼ、グルタミナーゼ遺伝子、新規な組み換え体DNA及びグルタミナーゼの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)のグルタミナーゼ。

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルタミナーゼ活性を有するタンパク質

【請求項2】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするグルタミナーゼ遺伝子。

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルタミナーゼ活性を有するタンパク質

【請求項3】 以下の(a)又は(b)のDNAからなるグルタミナーゼ遺伝子。

(a) 配列番号1に示される塩基配列からなるDNA

(b) (a)の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、グルタミナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項4】 請求項2又は3記載のグルタミナーゼ遺伝子をベクターDNAに挿入したことを特徴とする新規な組み換え体DNA。

【請求項5】 請求項4記載の組み換え体DNAを含む形質転換体又は形質導入体。

【請求項6】 請求項5記載の形質転換体又は形質導入体を培地に培養し、培養物からグルタミナーゼを採取することを特徴とするグルタミナーゼの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、グルタミナーゼ、

グルタミナーゼ遺伝子、新規な組み換え体DNA及びグルタミナーゼの製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】 グルタミナーゼは、L-グルタミンを加水分解して、アンモニア及びうま味成分であるL-グルタミン酸を生成させる酵素である。グルタミナーゼは、食品加工工業において重要な役割を果たしており、例えば、醤油あるいはタンパク質を酵素的に分解して得られる調味食品を製造する際に有用である。グルタミナーゼは、種々の生物種から単離されており、その酵素学的性質及びその遺伝子についての報告がなされている(例えば、特公平6-38748号公報)。醤油製造並びに麹菌を利用した調味食品の製造において、グルタミナーゼを遺伝子工学的手法で更に向上させ本酵素を多量に生産するためには、麹菌由来の本酵素の取得が重要である。これにより、容易にタンパク質加水分解物(例えば、醤油)の品質を向上させることができ、かつ安価に提供することが可能となる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、麹菌由来のグルタミナーゼ、グルタミナーゼ遺伝子、新規な組み換え体DNA及びグルタミナーゼの製造法の提供を目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】 そこで、本発明者等は、上記課題について種々検討した結果、アスペルギルス・ソーヤ(*Aspergillus sojae*)由来のグルタミナーゼ遺伝子を単離し、構造決定することに成功し、本発明を完成した。即ち、第1の発明は、以下の(a)又は(b)のグルタミナーゼである。

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルタミナーゼ活性を有するタンパク質

第2の発明は、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするグルタミナーゼ遺伝子である。

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルタミナーゼ活性を有するタンパク質

第3の発明は、以下の(a)又は(b)のDNAからなるグルタミナーゼ遺伝子である。

(a) 配列番号1に示される塩基配列からなるDNA

(b) (a)の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、グルタミナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

第4の発明は、上記グルタミナーゼ遺伝子をベクターDNAに挿入したことを特徴とする新規な組み換え体DNAである。第5の発明は、上記組み換え体DNAを含む形質転換体又は形質導入体である。第6の発明は、上記形質転換体又は形質導入体を培地に培養し、培養物からグルタミナーゼを採取することを特徴とするグルタミナーゼの製造法である。

【0005】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に説明する。

1. グルタミナーゼ及びそれをコードする遺伝子。本発明のグルタミナーゼは、以下の(a)又は(b)のグルタミナーゼである。

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルタミナーゼ活性を有するタンパク質
(a)に示すタンパク質は、アスペルギルス(*Aspergillus*)属糸状菌の染色体DNA又はcDNA由来の天然型グルタミナーゼ遺伝子をクローニングし、これを適当なベクター-宿主系に導入して発現させることにより得られる。なお、該タンパク質は、(b)に示す通り、グルタミナーゼ活性を有する限り、(a)のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されていてもよい。本発明において「複数」とは、アミノ酸残基のグルタミナーゼタンパク質の立体構造における位置又は種類によっても異なり、通常2〜300個、好ましくは、2〜170個、更に好ましくは、2〜50個、最も好ましくは、2〜10個を意味する。

【0006】そのような変異型グルタミナーゼ、すなわち上記(b)のタンパク質は、天然型グルタミナーゼ遺伝子の塩基配列に対して置換、欠損、挿入、付加又は逆位等の変異を導入して変異型グルタミナーゼ遺伝子を作製し、これを適当なベクター-宿主系に導入して発現させることにより得られる。遺伝子への変異導入法としては、例えば、部位特異的変異誘導法、PCRによるランダム変異導入法、更には、遺伝子を選択的に開裂し、次いで、選択されたヌクレオチドを除去又は付加した後、遺伝子を連結する方法等が挙げられる。本発明のグルタミナーゼ遺伝子は、上記(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子である。なお、本発明のグルタミナーゼ遺伝子は、(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAとストリンジェントな条件でハイブリ

ダイズし、かつ、グルタミナーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。本発明において「ストリンジェントな条件」とは、例えば、ナトリウム濃度が50〜300mM、好ましくは150mMであり、温度が42〜68℃、好ましくは65℃での条件をいう。

【0007】上記(a)のタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子の一例としては、配列番号1記載の塩基配列を含むDNAが挙げられる。このDNAは、天然型グルタミナーゼ遺伝子である。天然型グルタミナーゼ遺伝子は、アスペルギルス属に属する糸状菌の染色体DNA又はcDNA由来の天然型遺伝子をクローニングすることにより得られる。遺伝子のクローニング方法としては、例えば、グルタミナーゼを精製して部分アミノ酸配列を決定した後、適当なプローブDNAを合成し、これを用いてアスペルギルス・ソーヤ染色体DNAからスクリーニングする方法が挙げられる。又、部分アミノ酸配列に基づき適当なプライマーDNAを作製して、5-RACE法又は3'-RACE法等の適当なポリメラーゼ連鎖反応(以下、PCR法と略称する。)により、該遺伝子の断片を含むDNAを増幅させ、これらを連結させて全長の遺伝子を含むDNAを得る方法も挙げられる。より詳細には、天然型グルタミナーゼ遺伝子は、以下のようにして取得できる。先ず、アスペルギルス・ソーヤFERM BP-6820を培養し、得られた菌体を液体窒素中で凍結させた後、乳鉢等を用いて物理的に磨砕することによりこまかい粉末状の菌体片とし、該菌体片から通常の方法により全RNA画分を抽出する。該抽出操作には、市販のRNA抽出キットが利用できる。

【0008】得られたRNA抽出液からエタノール沈殿によりRNAを回収し、このRNAから通常の方法によりポリA鎖を有するRNAを分画してもよい。該分画操作には市販のOligo dTカラムが利用できる。配列番号2のDNA配列を参考としてPCRに用いるプライマーを合成する。このプライマーDNAと上記のようにして得られたRNAを使用し、5-RACE法や3'-RACE法等の適当なRT-PCR反応により、該遺伝子の断片を含むDNAを増幅させ、これらを連結させて全長の遺伝子を含むDNAを得る。5-RACE法や3'-RACE法による部分cDNA合成操作には市販のキットが利用できる。前記cDNAを鋳型として、5'末端配列及び3'末端配列に相補的な合成プライマーを用いてPCRを行なうことにより、DNAを増幅する。増幅されたDNAは、通常の方法に準じてクローニングできる。増幅されたDNAを適当なベクターに挿入して組み換え体DNAを得る。クローニングには、TA Cloning Kit (Invitrogen社)等の市販のキットや、pUC119 (宝酒造社製)、pBR322 (宝酒造社製)、pBluescript SK+ (Stratagene社製)等の市販のプラスミドベクターDNA、λEMBL3 (Stratagene社製)等の市販のバクテリオファージベクターDNAが使用できる。

【0009】得られた組み換え体DNAを用いて、例えば、大腸菌K-12、好ましくは大腸菌JM109（宝酒造社製）、XL-Blue（Stratagene社製）等を形質転換又は形質導入して、夫々形質転換体又は形質導入体を得る。形質転換は、例えば、D.M.Morrisonの方法（Methods in Enzymology, 68, 326-331, 1979）により行なうことができる。また、形質導入は、例えば、B.Hohnの方法（Methods in Enzymology, 68, 299-309, 1979）により行なうことができる。宿主細胞としては、大腸菌の他、他の細菌、酵母、糸状菌、放線菌等の微生物や動物細胞等が利用できる。上記で増幅されたDNAの全塩基配列（配列番号1参照）は、例えば、Li-COR MODEL 4200Lシークエンサー（アロカ社より購入）、370DNAシークエンスシステム（パーキンエルマー社製）、CEQ2000XL DNAアナリシスシステム（ベックマン社製）を用いて解析できる。塩基配列を、部分アミノ酸配列の情報と比較することにより、天然型グルタミナーゼ遺伝子が取得できたか否かを確認することができる。そして、天然型グルタミナーゼ遺伝子の解析により、翻訳されるポリペプチド、すなわち、(a) のタンパク質のアミノ酸配列が確定される。

【0010】2. グルタミナーゼの製造法

本発明のグルタミナーゼを製造する場合は、先ず、グルタミナーゼ遺伝子を含有する組み換え体DNAを作製する。次いで、該組み換え体DNAを含む形質転換体又は形質導入体を作製し、これらを培養し、培養物からグルタミナーゼを採取すればよい。本発明のグルタミナーゼ遺伝子を用いて、グルタミナーゼ活性を有するタンパク質を生産するためには、好適なベクター-宿主系を選択する必要がある。そのような系としては、pST14（Unkles et al., 1989, Mol. Gen. Genet., 218, 99-104）及び糸状菌〔アスペルギルス・ソーヤ（*Aspergillus sojae*）、アスペルギルス・オリゼー（*Aspergillus oryzae*）、アスペルギルス・ニドゥランシス（*Aspergillus nidulans*）、アスペルギルス・ニガー（*Aspergillus niger*）、ペニシリウム・チリゾゲナム（*Penicillium chrysogenum*）等〕の系、酵母発現ベクターpYES2（Invitrogen社製）及び酵母サッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）の系、大腸菌発現ベクターpTE（Stratagene社製）及び大腸菌エッシャーリア・コリ（*Escherichia coli*）の系等が挙げられる。タンパク質への糖鎖付加がおこるといふ点で糸状菌又は酵母の系を使用することが好ましい。組み換え体DNAは、グルタミナーゼ遺伝子を適当なベクターに挿入することにより得られる。ベクターとしては、市販品、例えば、酵母発現ベクターpYES2、pYD1（Invitrogen社製）、pUR123（宝酒造社製）、pYEX-BX、pYEX-S1、pYEX-4T（CLONTECH社製）、大腸菌発現ベクターpSET（Invitrogen社製）、pTE（Stratagene社製）等が使用できる。

【0011】次いで、該組み換え体DNAを宿主細胞に形質転換又は形質導入する。酵母への形質導入は、例え

ば、Becker DM等の方法（Methods in Enzymology, 194, 182-187, 1991）により行なうことができる。宿主細胞としては、大腸菌又は酵母の他、他の細菌、糸状菌、放線菌等の微生物あるいは動物細胞が使用可能である。以上によりグルタミナーゼ生産能を有する形質転換体又は形質導入体が得られる。形質転換体又は形質導入体を培養するには、通常の固体培養法で培養しても良いが、可能なかぎり液体培養法を採用することが好ましい。宿主として酵母を用いた場合、培地としては、例えば、YPD培地あるいはYM培地等の一般的な富栄養培地が使用できる。また、宿主の遺伝的性質から選択培地を使用する場合は、最小培地であるSD培地が使用できる。選択培地を使用する場合は、使用した宿主ベクター系によって選択圧が異なるため、適宜、宿主の遺伝的要求性に応じて、選択圧以外のアミノ酸あるいは核酸等を、最小培地に添加する。その他、必要により、培地に無機塩類、糖質原料、ビタミン類等を適宜添加してもよい。なお、培地の初発pHは、pH6～9に調製するのが適当である。更に、使用するベクターによってはタンパク質の発現を調節できるものもある。それらのベクターを使用する場合は、ベクターに応じた誘導剤、例えば、ガラクトースや銅イオンを添加してグルタミナーゼを誘導することができる。酵母を培養する場合は、25～35℃、好ましくは30℃前後で、24～48時間通気攪拌深部培養、振盪培養、静置培養等により培養することが好ましい。発現したグルタミナーゼを、特開平11-332553号公報記載の方法を一部改変した方法により精製できる。酵母の場合では、該形質転換酵母を上記の適当な方法で培養後、培養液を遠心分離して菌体を得る。該菌体に細胞壁溶解酵素を加え十分に細胞壁を溶解させた後、遠心分離して上澄み液を得る。この上澄み液に硫酸アンモニウムを添加し塩析させ、更に、遠心分離して不溶性タンパク質を除きグルタミナーゼを含む粗酵素液を得る。粗酵素液からフェニルセファロースカラム、DEAE-セファロースカラム、ゲル濾過カラム、HPLCを用いて、グルタミナーゼ活性画分を精製することにより精製されたグルタミナーゼを得ることができる。なお、本発明における遺伝子工学的方法は、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」（1989）、Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-8769-309-6、「Current Protocols in Molecular Biology」（1989）、John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-50338-X等の記載に準じて実行可能である。

【0012】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に具体的に説明する。

実施例1 グルタミナーゼcDNAの取得

(1) アスペルギルス（*Aspergillus*）属菌におけるグルタミナーゼ相同遺伝子の検索
既知のクリプトコッカス由来グルタミナーゼ遺伝子（特

願2000-270371号公報)と相同性の高い遺伝子を独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターの麹菌ESTライブラリーから検索したところ、711塩基からなるESTクローンContig Mix0010110003775_1を得た。該クローンをグルタミナーゼ遺伝子の断片であると推定し、該遺伝子のcDNAのクローニングを行なった。

【0013】アスペルギルス・ソーヤ (*Aspergillus sojae*) からの全RNA抽出

アスペルギルス・ソーヤFERM BP-6820の胞子を大豆粉培地 (3% 大豆粉、1% KH_2PO_4 、pH6.0) 50mlに 3×10^5 /mlとなるように接種し、150ml三角フラスコ中で30℃、48時間、150r.p.m.で振盪培養した。培養終了後得られた培養液をMiracloth (CALBIOCHEM社製)で濾過して菌体を集めた。集めた菌体を滅菌水で洗浄した後、液体窒素中で凍結させ乳鉢を用いて物理的に磨砕し、細かい粉末状の菌体片とした。菌体片からISOGEN (ニッポンジーン社製)を用いて全RNAを抽出した。全ての操作は添付のプロトコールに従った。

【0014】(2) RACE法を用いたグルタミナーゼcDNAの取得

上記で得られた全RNA約200 μg からOligotex-dT30<Super> mRNA Purification Kit (宝酒造社製)を用いて4 μg のmRNAを得た。そのうち1 μg のmRNAからMarathon cDNA Amplification Kit (Clontech社製)、Advantage cDNA PCR kit (Clontech社製)を用いて5-RACE及び3'-RACEを行なった。RACE法に使用するプライマーとして配列番号3~6で夫々表されるオリゴDNAを合成した。すなわち5-RACEを行なうためにESTクローンCONFIG MIX0010110003775_1に対してアンチセンスのプライマー (配列番号3及び4) 及び3'-RACEを行なうためのセンスのプライマー (配列番号5及び6)である。全ての操作は添付のプロトコールに従った。PCRの装置としてGeneAmp5700

DNA detection system (Perkin Elmer社製)を使用した。その結果、グルタミナーゼcDNA 5'領域に相当する約1.7kbのDNA断片及び3'領域に相当する約0.8kbのDNA断片の増幅を確認した。増幅されたDNA断片を0.7%アガロースゲル中で分離し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて抽出した。操作は添付のプロトコールに従った。抽出されたDNA断片は、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社製)を用いてpCR2.1-TOPOベクターに組み込んだ。得られた組み換え体プラスミドは、Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いてシーケンシング反応を行ない、LI-COR MODEL4200Lシーケンサー (アロカ社より購入)で塩基配列を決定した。その結果配列番号1に示す約1.9kbのオープンリーディングフレーム (ORF) のDNA配列が明らかとなり、ESTクローンCONFIG MIX0010110003775_1はその部分断片であることが明らかとなった。

【0015】このDNAは、643アミノ酸からなるタンパク

質をコードしていた。このアミノ酸配列は、配列番号2に記載する。更に、このアミノ酸配列を公知のアミノ酸配列データベースに対して相同性検索した。相同性検索には、NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)を用いた。その結果公知のタンパク質で該ORFと一致するものはなかった。しかし、クリプトコッカス・アルビダス及びクリプトコッカス・ノダエンシス由来グルタミナーゼとの相同性検定を行なったところ、活性中心と予想される領域で相同性が認められ、該ORFがグルタミナーゼをコードしていることが示唆された。5-RACEを行なう際作製したcDNAを鋳型としてPCRを行ない、グルタミナーゼの全長cDNAをクローニングした。プライマーには配列番号7及び8に示すオリゴDNAを用いた。得られた約2.1kbの増幅DNA断片は、既に述べた方法で抽出しTOPOTA Cloning Kit (Invitrogen社製)を用いてpCR2.1-TOPOベクターに組み込み、グルタミナーゼ全長cDNAを含む組み換え体プラスミドpASglnを得た。組み換え体プラスミドpASglnの塩基配列を再び解析し、グルタミナーゼcDNAの塩基配列を確定した (配列番号1)。全長グルタミナーゼcDNA、すなわち、配列番号1の塩基番号1~1932で表される塩基配列を含むplasmid pASglnは、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにFERM BP-7634として寄託されている。

【0016】実施例2 グルタミナーゼcDNAの発現

上記のplasmid pASglnを制限酵素Bam HI及びSph I (共に宝酒造社製)で酵素処理した後、0.7%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の大きさ (約2.0 kbp)のDNA断片を切り出し精製した。次いで、これらDNA断片を同制限酵素で酵素処理した酵母発現ベクターpYES2 (Invitrogen社製)に組み込み、組み換え体プラスミドpYES-ASglnを作製した。上記の組み換え体プラスミドは、ガラクトースにより目的タンパク質グルタミナーゼの誘導発現が可能である。宿主は、添付のINVScl (Genotype: MATa, his3 Δ 1, leu2, trp1-289, ura3-52/ MAT α , his3 Δ 1, leu2, trp1-289, ura3-52)を使用し、酢酸リチウム法により、上記の組み換え体プラスミドpYES-ASglnで宿主酵母を形質転換した。選択培地には、0.67% Yeast Nitrogen base without aminoacids (Difco社製)、2% raffinose (和光純薬工業社製)及び0.192% Yeast Synthetic Dropout Medium Supplement without uracil (SIGMA社製)を使用した。酢酸リチウム法は、「タンパク質実験プロトコール-機能解析編-」(細胞工学別冊: 秀潤社)の記載に従った。次いで、得られた形質転換体を用いて、pYES2ベクター (Invitrogen社製)に添付のプロトコールに従い、タンパク質の発現を行なった。200 ml用コブ付三角フラスコを用いて選択培地20 mlに形質転換体をコロニーより植菌し、30℃、140 r.p.m.で約14時間振盪培養し、これを種培養とした。

【0017】次いで、種培養の濁度 (OD_{600})を測定し、初期濁度が $\text{OD}_{600} = 0.4$ となるようにタンパク質発現誘

導培地へ種培養を接種した。タンパク質発現誘導培地による培養は500 ml用坂口フラスコを使用し、培地50 mlで30℃、140 r.p.m.で振盪培養した。タンパク質発現誘導培地は、1% Yeast Extract (Difco社製)、2% Poly Peptone(日本製薬株式会社製)、1% raffinose及び2% galactose (以上SIGMA社製)を使用した。遠心、集菌した菌体を蒸留水に懸濁し酵素液として供した。グルタミナーゼ活性は、特開平11-332553号公報記載の方法を一部改変した方法で測定した。すなわち、2%(W/V)L-グルタミン溶液250 μ lに0.2 Mリン酸緩衝液(pH 6.5) 500 μ l及び酵素液500 μ lを加え、37℃、30分間反応させた後、0.75 N過塩素酸液250 μ lを添加して反応を停止させ、これに1.5N水酸化ナトリウム液125 μ lを加え、反応液を中和した。上記の反応液を遠心(10000 r.p.m.、10分)し、上清100 μ lに0.1 M塩酸ヒドロキシルアミン緩衝液1.0 ml (pH 8.0)、20 mM NAD⁺溶液(オリエンタル酵

* 母社製)1.0 ml及び500単位/mlのL-グルタミン酸脱水素酵素液(SHIGMA社製)50 μ lを添加し、37℃で30分間反応させ、分光光度計により340 nmにおける吸光度を測定した。上記の条件下で1分間あたり1 μ モルのグルタミン酸を生成する酵素量を1単位(U)とした。

【0018】形質転換体のグルタミナーゼ活性測定の結果を表1に示す。表中の数値は、培養24時間後(OD₆₀₀ = 15)の培養液1 ml当たりのグルタミナーゼ活性(mU/ml)を示す。「pYES2」は、プラスミドpYES2による形質転換体、「pYES-ASgln」は、プラスミドpYES-ASglnによる形質転換体を夫々示す。また「-」は、ガラクトースを含まないタンパク質発現非誘導培地、「+」は、ガラクトースを含むタンパク質発現誘導培地で誘導したことを示す。

表1

プラスミド/ガラクトース -		+
PYES2	0.33	2.50
PYES-ASgln	4.64	32.87

プラスミドpYES-ASglnの形質転換体は、ガラクトースを含むタンパク質発現誘導培地で培養した際にプラスミドpYES2の形質形質転換体と比較してグルタミナーゼ活性が上昇していた。また、プラスミドpYES-ASglnの形質形質転換体をガラクトースを含まないタンパク質非発現誘導培地で培養した時はグルタミナーゼ活性は、上昇しなかった。このことからプラスミドpYES-ASglnの形質形質転換体のグルタミナーゼ活性は、導入したグルタミナーゼ遺伝子に由来することが明らかとなった(表1)。宿※

※主にINVSc1を用いてグルタミナーゼを発現させた場合にもアスペルギルス属菌と同様にグルタミナーゼ活性は、菌体表面に発現した。

【0019】

【発明の効果】本発明によれば、グルタミナーゼを効率よく生産することができるので、本発明は、産業上極めて有用である。

【0020】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KIKKOMAN CORPORATION

<120> A GLUTAMINASE, A GLUTAMINASE GENE, A NOVEL RECOMBINANT DNA, AND A PROCESS FOR PRODUCING A GLUTAMINASE

<130> P2218

<160> 8

<210> 1

<211> 1932

<212> DNA

<213> Aspergillus sojae

<400> 1

```

atgtttctta gtacactcct ctacactggcg gcggctcgtg ccggcgctgc catccccaat    60
ggccagagcg ttctctcaaa tgacattcct tactatgtga gcggcattcc tgtgtcaact    120
ttgcaagggg acaatgcctc tgcataatgct gctttgacaa aggggaataga ttgggtgcca    180
ttaactgtca ttccgtgaac tcctaccacg aacttggagt cgctgctatc ggactatggt    240
gaacgcgatg atgtcttcca gccggctttt ctgcgtgcag tctatctcac agcttccact    300
gctgatgaca ttgactccca actgagcaat tatgcgtcaa ttctcaagtc ttccggcacc    360
gacgtgctgc tggttgattc agaagtacac accgcttcgt cagattccac aatcacagcg    420
cagttgacca aagagctgcc gactgggcct tattttgtct ctttgtatgc tggagaggtg    480

```

tttagagcgt accggttgta ccttgacgac aacctagctt tcattcaagc aggaatcagt 540
 gacgagaagg gagggtgctt gcccclacca gccgtgacag aaaacgcat gaccaaaagac 600
 gttgccgtgc ctacacgtct ctattataca ccgaccgcag aaaagccatt agccggctcg 660
 aggttaggtg tcaaggatat ctaccacgtt aaaggcttca agacagtggt cggcagtcgc 720
 tctattatt attatacgg aactcagaat gtcactgccc catctattca gagactgttg 780
 gacttaggcg cggctcttgt cggtaaaact gggaccgttc agtttgctaa cggatgcga 840
 cctactgccg aciggggtgga ttccactgt ccattcaacc aacgcggaga aggatatcag 900
 gcacctagcg gtctctctc cggctcaggt gtggctattg cagcclacga ctggttgac 960
 cttgtgtcg gtagtgacac tggcggttca atgcgttccc cagctgcagt tcaagggata 1020
 tatggcaaca gccatctac tggcgtatc tctctagatc atgtcttacc tctctcgccg 1080
 gctctggata cagcgggcgt ctttggccga agtgcctcac tatggtccca tactgtgcaa 1140
 gcttggatc ctcactcca gcacaatttt acgtcttcc ctggcagct gctcctagcc 1200
 ggtggggat gggatggtaa aggcacagct cccgagggcc atcagagctt taccacattc 1260
 acacgtgggc ttgaggcatt cctcggaaca aaccatacca atgtcgagct gtgcagcga 1320
 tggcttgaca cacactctcc caccacacca agcctggaag agatgctcaa cctgacctat 1380
 gccacactta cttctgtgga tcagttcaac cacctagccg tccctctctt tctgactat 1440
 aaagccgtcc accgcggtcg tcagcctttc attaaccccg gccattagc gcgttggcag 1500
 tggggccagg cgaatggcgg aaacacctcg tacgatgcag ctctgcgcaa catgactact 1560
 ttccgaaact ggtgggagaa gtccgggtat ggtcagtcg ataatgcctc ttgtccagg 1620
 tcgcttttcg tcagtgtgta tccggtcggc accactgact accgtaacca atattatgag 1680
 gcgccacta caccctcact gggattctcg atcgagcga tcgcggtatt aggtggagca 1740
 cctgaggttg ttgttctgt gggagagtc ccatacaata gtactatctc ttgcagacc 1800
 gagtatttgc cggtcagtggt tgcgctgcag atggcgcgag gatgtgacca tgttctgct 1860
 tcttggctg ctggccttga gaagaaggc gtctctcgac ctgtcaglac cggctctgc 1920
 ctatactct aa 1932

<210> 2

<211> 643

<212> PRT

<213> Aspergillus sojae

<400> 2

Met Phe Leu Ser Thr Leu Leu Ser Leu Ala Ala Val Val Ala Gly
 1 5 10 15
 Ala Ala Ile Pro Asn Gly Gln Thr Leu Ser Leu Asn Asp Ile Pro
 20 25 30
 Tyr Tyr Val Ser Gly Ile Pro Val Ser Thr Leu Gln Gly Tyr Asn
 35 40 45
 Ala Ser Ala Tyr Ala Ala Leu Thr Lys Gly Ile Asp Leu Val Pro
 50 55 60
 Leu Thr Val Ile Pro Val Thr Pro Thr Thr Asn Leu Glu Ser Leu
 65 70 75
 Leu Ser Asp Tyr Val Glu Arg Asp Asp Val Phe Gln Pro Ala Phe
 80 85 90
 Leu Arg Ala Val Tyr Leu Thr Ala Ser Thr Ala Asp Asp Ile Asp
 95 100 105
 Ser Gln Leu Ser Asn Tyr Ala Ser Ile Leu Lys Ser Ser Gly Thr
 110 115 120
 Asp Val Leu Leu Val Asp Ser Glu Val His Thr Ala Ser Ser Asp
 125 130 135
 Ser Thr Ile Thr Ala Gln Leu Thr Lys Glu Leu Pro Ser Gly Pro

	140		145		150
Tyr Phe Val Ser	Leu Tyr Thr Gly Glu	Val Phe Arg Ala Tyr Arg			
	155		160		165
Leu Tyr Pro Asp	Asp Asn Leu Ala Phe	Ile Gln Ala Gly Ile Ser			
	170		175		180
Asp Glu Lys Gly	Gly Val Leu Pro Leu	Pro Ala Val Thr Glu Asn			
	185		190		195
Ala Met Thr Lys	Asp Val Ala Val Pro	Ser Arg Leu Tyr Tyr Thr			
	200		205		210
Pro Thr Ala Glu	Lys Pro Leu Ala Gly	Leu Arg Leu Gly Val Lys			
	215		220		225
Asp Ile Tyr His	Val Lys Gly Leu Lys	Thr Ser Gly Gly Ser Arg			
	230		235		240
Ser Tyr Tyr Tyr	Leu Tyr Gly Thr Gln	Asn Val Thr Ala Pro Ser			
	245		250		255
Ile Gln Arg Leu	Leu Asp Leu Gly Ala	Val Phe Val Gly Lys Thr			
	260		265		270
Gly Thr Val Gln	Phe Ala Asn Gly Asp	Arg Pro Thr Ala Asp Trp			
	275		280		285
Val Asp Phe His	Cys Pro Phe Asn Gln	Arg Gly Glu Gly Tyr Gln			
	290		295		300
Ala Pro Ser Gly	Ser Ser Ser Gly Ser	Gly Val Ala Ile Ala Ala			
	305		310		315
Tyr Asp Trp Leu	Asp Leu Ala Val Gly	Ser Asp Thr Gly Gly Ser			
	320		325		330
Met Arg Ser Pro	Ala Ala Val Gln Gly	Ile Tyr Gly Asn Arg Pro			
	335		340		345
Ser Thr Gly Ala	Ile Ser Leu Asp His	Val Leu Pro Leu Ser Pro			
	350		355		360
Ala Leu Asp Thr	Ala Gly Val Phe Ala	Arg Ser Ala Ser Leu Trp			
	365		370		375
Ser His Thr Val	Gln Ala Trp Tyr Pro	His Leu Gln His Asn Phe			
	380		385		390
Thr Ser Phe Pro	Arg Gln Leu Leu Leu	Ala Gly Gly Gly Trp Asp			
	395		400		405
Gly Lys Gly Ile	Ser Pro Glu Ala His	Gln Ser Leu Thr Thr Phe			
	410		415		420
Thr Arg Gly Leu	Glu Ala Phe Leu Gly	Thr Asn His Thr Asn Val			
	425		430		435
Asp Val Ser Gln	Arg Trp Leu Asp Thr	His Ser Pro Thr Thr Pro			
	440		445		450
Ser Leu Glu Glu	Met Leu Asn Leu Thr	Tyr Ala Thr Leu Thr Ser			
	455		460		465
Val Asp Gln Phe	Asn His Leu Ala Val	Pro Leu Phe Ala Asp Tyr			
	470		475		480
Lys Ala Val His	Arg Gly Arg Gln Pro	Phe Ile Asn Pro Gly Pro			
	485		490		495
Leu Ala Arg Trp	Gln Trp Gly Gln Ala	Asn Gly Gly Asn Thr Ser			
	500		505		510
Tyr Asp Ala Ala	Leu Arg Asn Met Thr	Thr Phe Arg Asn Trp Trp			

515	520	525
Glu Lys Ser Gly Tyr Gly Gln Ser Asp	Asn Ala Ser Cys Ser Arg	
530	535	540
Ser Leu Phe Val Ser Val Tyr Ser Val	Gly Thr Thr Asp Tyr Arg	
545	550	555
Asn Gln Tyr Tyr Glu Ala Pro Thr Thr	Pro Pro Leu Gly Phe Ser	
560	565	570
Ile Gly Arg Ile Ala Val Leu Gly Gly	Ala Pro Glu Val Val Val	
575	580	585
Pro Val Gly Glu Ser Pro Tyr Asn Ser	Thr Ile Ser Leu Gln Thr	
590	595	600
Glu Tyr Leu Pro Val Ser Val Ala Leu	Gln Met Ala Arg Gly Cys	
605	610	615
Asp His Val Leu Ala Ser Leu Val Ala	Gly Leu Glu Lys Lys Gly	
620	625	630
Val Leu Arg Pro Val Ser Thr Gly Ser	Arg Leu Tyr Ser	
635	640	643

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

tagctatggt cccgtactgt gcaagcttgg 30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

atggcttgac acacaatctc ccaccacacc 30

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

gcagcgcaac actgaccggc aaatactcgg 30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

aagagcgact tggagcagga ggcacatcgg 30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7
ggtgacagac tggatccatc atgtttctta 30

 <210> 8
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 8
ttgtttgaac cggcatgctc tactttgtac 30

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード(参考)
C 1 2 N 9/80		C 1 2 N 5/00	A
F ターム(参考) 4B024 AA05 BA11 CA04 DA12			
4B050 CC03 DD03 LL02			
4B065 AA60Y AA72X AB01 CA31			
CA42			